

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-155263

(43)Date of publication of application : 19.06.1989

---

(51)Int.Cl. G01N 30/48  
B01J 20/04  
C12P 21/00  
// C07K 3/20

---

(21)Application number : 62-314420 (71)Applicant : ASAHI OPTICAL CO LTD

(22)Date of filing : 12.12.1987 (72)Inventor : FUJINUMA SATORU  
KOJIMA SATOSHI

---

**(54) FILLER FOR LIQUID CHROMATOGRAPHY AND PREPARATION THEREOF**

**(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To improve resistance to acids and to give a high separating power to a group of substances in a wide range, by using apatite of which a prescribed quantity of particle components contains tin and/or lead, as a filler.

**CONSTITUTION:** Apatite of which 55W100mol.% of particle components contain tin and/or lead is used as a filler for liquid chromatography. This apatite can be synthesized by a method wherein an appropriate mixture of a phosphoric acid or water-soluble phosphate, a Ca compound and a water-soluble lead compound and/or water-soluble tin compound is made to react by a wet or dry method. The filler can be obtained also by immersing the apatite in a water solution containing the water-soluble compound of lead and/or tin. The apatite needs only to be apatite of which the surface of a particle at least contains tin and/or lead.

---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開  
 ⑫ 公開特許公報 (A) 平1-155263

⑬ Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	府内整理番号	⑭ 公開 平成1年(1989)6月19日
G 01 N 30/48		C-7621-2G	
B 01 J 20/04		C-6939-4G	
C 12 P 21/00		B-6712-4B	
// C 07 K 3/20		8318-4H 審査請求 未請求 発明の数 2 (全 5 頁)	

⑮ 発明の名称 液体クロマトグラフィー用充填剤及びその製法

⑯ 特願 昭62-314420  
 ⑰ 出願 昭62(1987)12月12日

⑮ 発明者 藤沼哲	東京都板橋区前野町2丁目36番9号 旭光学工業株式会社内
⑮ 発明者 小島聰	東京都板橋区前野町2丁目36番9号 旭光学工業株式会社内
⑯ 出願人 旭光学工業株式会社	東京都板橋区前野町2丁目36番9号
⑰ 代理人 弁理士 三浦邦夫	

明細書

1. 発明の名称

液体クロマトグラフィー用充填剤及びその製法

2. 特許請求の範囲

(1) 粒子成分のうち5~100モル%が錫及び/又は鉛を含むアバタイトであることを特徴とする液体クロマトグラフィー用充填剤。

(2) 少なくとも粒子表面が錫及び/又は鉛を含むアバタイトである特許請求の範囲第1項記載の液体クロマトグラフィー用充填剤。

(3) アバタイト粒子凝聚体を錫イオン及び/又は鉛イオンを含む水溶液中で攪拌し、粒子成分の5~100モル%を錫及び/又は鉛を含むアバタイトに変えることを特徴とする液体クロマトグラフィー用充填剤の製法

3. 発明の詳細な説明

「利用分野」

本発明は、液体クロマトグラフィー用充填剤に係り、更に詳しくは例えば蛋白質、酵素、核酸等の分離精製に用いられる液体クロマトグラフィー

に使用される充填剤に関する。

「従来技術及びその問題点」

液体クロマトグラフィー用充填剤としては、従来、シリカゲル、化学修飾シリカゲル、高分子ゲル等が一般に使用されてきた。また、ハイドロキシアバタイト [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] は、その優れた生体親和性から、蛋白質、核酸、糖、配糖体等の生体高分子を分離する液体クロマトグラフィーに使用する充填剤として利用されている。

しかしながら、ハイドロキシアバタイト充填剤は、耐溶解性に問題があり、充分な機能を果たせない場合があった。すなわち、ハイドロキシアバタイト充填剤を充填したカラムに酸性の移動相を長時間流すと、粒子表面からハイドロキシアバタイトの結晶が溶出し、微結晶粒子となって移動相流路を閉塞させ、使用不能の状態に陥ったりするという欠点があった。このように、従来のハイドロキシアバタイト充填剤は、酸性領域における分離操作には適さないものであり、従って分離対象となる物質は限定されてしまうという。

## 特開平1-155263(2)

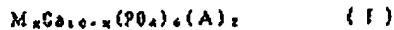
## 「発明の目的」

本発明の目的は、従来のハイドロキシアバタイト充填剤の利点をそのまま維持しながら耐酸性を向上させ、広範囲の物質群に対して高い分離性能を示す液体クロマトグラフィー用充填剤及びその製法を提供することにある。

## 「発明の構成」

本発明の液体クロマトグラフィー用充填剤は、粒子成分のうち5~100モル%が錫及び/又は鉛を含むアバタイトであることを特徴とする。

本発明に使用する錫及び/又は鉛を含むアバタイトは、一般式(1)：



〔式中MはPb及びSnの一方又は両方を表わし、AはOH、Cl又はFを示し、zは0.5~1.0の実数を示す。〕で表わされる物質である。

上記のような錫及び/又は鉛を含むアバタイトは、合成又はイオン交換法により製造することができる。

本発明に使用する錫及び/又は鉛を含むアバ

タイトを合成する場合には、リン酸又は水溶性リン酸塩、カルシウム化合物及び/又は水溶性鉛化合物及び/又は水溶性錫化合物を適切な割合で水溶液中で反応させる湿式合成法や、リン酸化合物とカルシウム化合物及び鉛化合物及び/又は錫化合物を適切な割合で高温下で反応させる乾式合成法等、各種の方法で合成することができる。

イオン交換法により錫及び/又は鉛を含むアバタイトを製造する場合には、クロマトグラフィー用充填剤として使用しうるアバタイト粒子を水溶性鉛化合物及び/又は水溶性錫化合物を含む水溶液中に浸漬すればよい。

水溶性鉛化合物としては、例えば塩化鉛、沸化鉛等を使用することができ、水溶性錫化合物としては、例えば塩化錫、沸化錫等を使用することができる。

本発明の液体クロマトグラフィー用充填剤は、上記のように、粒子成分の5~100モル%が一般式(1)で表わされる錫及び/又は鉛を含むアバタイトで形成されればよい。錫及び/又は

鉛を含むアバタイトが粒子成分の5モル%未満であると、耐酸性向上効果が不十分となる。

本発明の液体クロマトグラフィー用充填剤は、例えば下記の態様で存在しうる：

① 粒子全體が一般式(1)で表わされる錫及び/又は鉛を含むアバタイトで形成されているもの、  
② アバタイト粒子の表面が一般式(1)で表わされる錫及び/又は鉛を含むアバタイトで形成されているもの、  
あるいは

③ 不活性担体の粒子の表面に一般式(1)で表わされる錫及び/又は鉛を含むアバタイトをコーティングしたもの。

粒子全體が一般式(1)で表わされる錫及び/又は鉛を含むアバタイトから成る液体クロマトグラフィー用充填剤は、上記のようにして製造した錫及び/又は鉛を含むアバタイトの粒状凝聚体を適切な温度で熱処理することにより得られる。

また、アバタイトから成る粒子の表面が一般式(1)で表わされる錫及び/又は鉛を含むアバ

タイトで形成されている充填剤は、アバタイトの粒状凝聚体を水溶性鉛化合物及び/又は水溶性錫化合物を含む水溶液中に浸漬することにより得られる。浸漬は、通常酸性条件下で5~90℃の温度で0.5~10時間行う。

さらに、例えばアルミナ等の不活性担体の粒子の表面に一般式(1)で表わされる錫及び/又は鉛を含むアバタイトをコーティングして成るクロマトグラフィー用充填剤は、例えばスパッタリング等により製造することができる。

本発明の液体クロマトグラフィー用充填剤において、充填剤の粒径、形状及び多孔性等は、特に限定されるものではなく、液体クロマトグラフィー用充填剤としての一般的な粒子設計を行うことができ、その都度の使用目的に応じて適宜選定することができる。一般に、充填剤は、球状であるのが好ましい。

本発明の液体クロマトグラフィー用充填剤は、例えば蛋白質、酵素、核酸、糖、配糖体等の分離に好適に用いられ、リン酸、塩酸等の酸性溶液

## 特開平1-155263(3)

條件においても安定した分離性能を得ることができる。

## 「実施例」

次に、本発明を実施例及び比較例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

## 実施例 1

(1) S<sub>6</sub> 含有アバタイトの製造

塩化第一錫 2.25 g 及び第化第一錫 6.28 g を水 2 L に溶解し、これに 1.2 g の球状ハイドロキシアバタイト粒子凝聚体を混合し、pH を 3.0 に制御し、2 時間反応させた。得られた反応生成物をロ過し、乾燥し、粉末状充填剤を得た。この反応により S<sub>6</sub> 含有アバタイトが生成したことは、X 線回折図、原子吸光等により確認された。

## (2) クロマトグラフィー

(1) 得られた充填剤を直徑 7.5 mm、高さ 100 mm のステンレスカラムに充填し、リン酸緩衝液 (pH 6.8) にウシ血清アルブミン 0.02 g / ml、リゾチーム 1.25 g / ml 及びテトラ

合し、pH 3.0 に制御し、2 時間反応させた。得られた反応生成物をロ過し、乾燥し、粉末状充填剤を得た。この反応により Pb 含有アバタイトが生成したことは、X 線回折図、原子吸光等により確認された。

## (2) クロマトグラフィー

(1) 得られた充填剤を直徑 7.5 mm、高さ 100 mm のステンレスカラムに充填し、実施例 1 と同じ試料溶液をクロマトグラフィー分離し、得られたクロマトグラムを第 2 A 図に示す。

## 実施例 4

実施例 3 で得られた充填剤を用いて、pH 4.0 の 0.4 M リン酸ナトリウム緩衝液を流速 1 ml / 分で 5 時間通液した後、実施例 1 (2) と同じ試料溶液をクロマトグラフィー分離し、得られたクロマトグラムを第 2 B 図に示す。

第 2 A 図及び第 2 B 図から明らかなとおり、鉛含有アバタイト充填剤を用いると、0.4 M リン酸ナトリウム緩衝液を 5 時間通液しても、ピーク割れが起こらず、高い分離性能が達成された。

ロム C 5.0 g / ml を溶解して成る試料溶液を流速 1.0 ml / 分で流し、クロマトグラムを得た。このクロマトグラムを第 1 A 図に示す。図面において、1 はウシ血清アルブミンのピーク、2 はリゾチームのピーク、3 はテトラクロム C のピークを示す。

## 実施例 2

実施例 1 で得られた充填剤を用いて、pH 4.0 の 0.4 M リン酸ナトリウム緩衝液を流速 1 ml / 分で 5 時間通液した後、実施例 1 (2) と同じ試料溶液をクロマトグラフィー分離し、得られたクロマトグラムを第 1 B 図に示す。

第 1 A 図及び第 1 B 図から明らかなとおり、鉛含有アバタイト充填剤を用いると、0.4 M リン酸ナトリウム緩衝液を 5 時間通液しても、ピーク割れが起こらず、高い分離性能が達成された。

## 実施例 3

## (1) Pb 含有アバタイトの製造

塩化鉛 21.8 g を水 2 L に溶解し、これに 1.5 g の球状ハイドロキシアバタイト粒子凝聚体を混

## 比較例 1

充填剤として従来のハイドロキシアバタイトを使用した以外は、実施例 1 (2) と同様にしてクロマトグラフィーを実施し、得られたクロマトグラムを第 3 A 図に示す。

## 比較例 2

pH 4.0 の 0.4 M リン酸ナトリウム緩衝液を 1 時間通液後、実施例 1 (2) と同様にしてクロマトグラフィーを実施し、得られたクロマトグラムを第 3 B 図に示す。

第 3 B 図のクロマトグラムにおいては、0.4 M リン酸ナトリウム緩衝液を 1 時間通液したことによりカラムが劣化したことを示すピーク割れが出現した。

## 「発明の効果」

本発明の液体クロマトグラフィー用充填剤は、ハイドロキシアバタイトの持つ高い分離性能を維持し、しかも優れた耐酸性を有するので、酸性溶液を長時間通液しても、カラムは劣化せず、酸性領域においても長時間安定して広範な物質、特に

特開平1-155263(4)

蛋白質、酵素、核酸、糖、配糖体等の物質の分離  
精製に好適に用いることができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1 A図は本発明の実施例1で得られたクロマトグラム、第1 B図は本発明の実施例2で得られたクロマトグラム、第2 A図は本発明の実施例3で得られたクロマトグラム、第2 B図は本発明の実施例4で得られたクロマトグラム、第3 A図は比較例1で得られたクロマトグラム、第3 B図は比較例2で得られたクロマトグラムを示す。

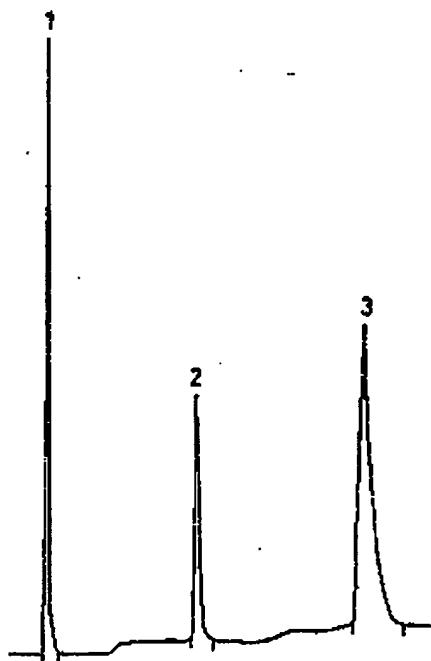
#### 符号の説明

- 1 . . . ウシ血清アルブミンのピーク、
- 2 . . . リゾチームのピーク
- 3 . . . チトクロムCのピーク

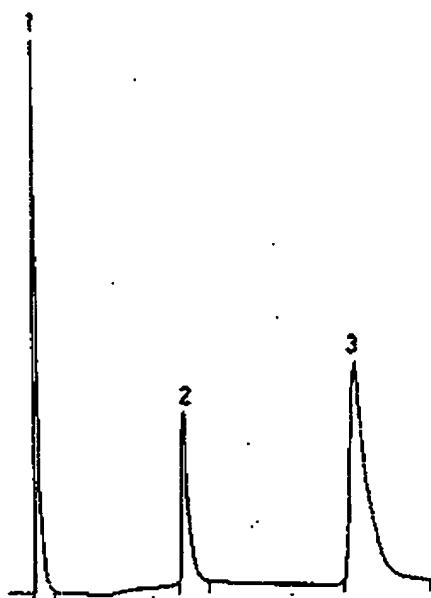
特許出願人 旭光学工業株式会社

代理人 弁理士 三浦邦夫

同 弁理士 鮎山善英

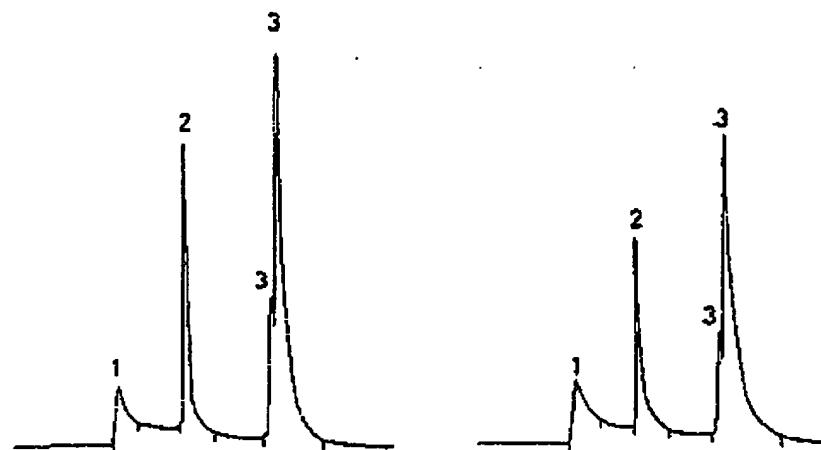


第1 A図



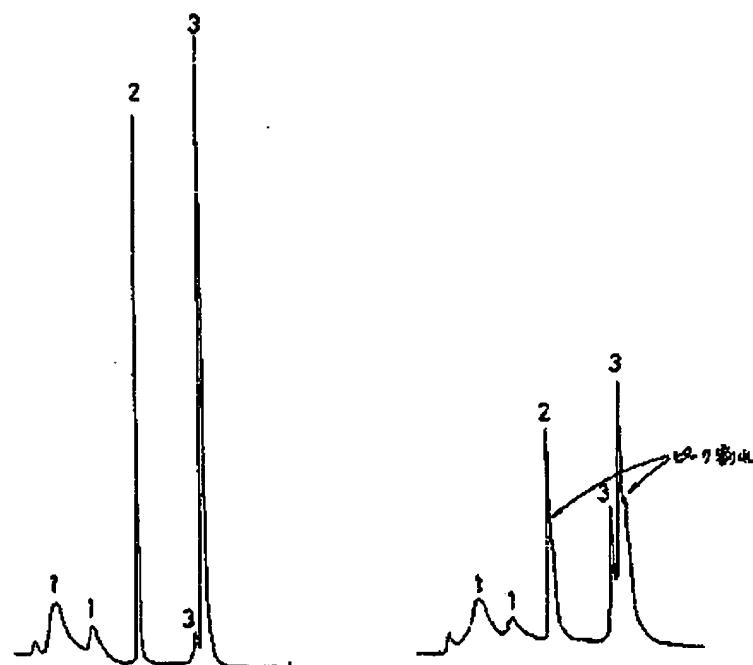
第1 B図

特開平1-155263(5)



第2A図

第2B図



第3A図

第3B図

特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
平4.5.15発行  
昭和 62 年特許願第 814420 号 (特開平  
1-155263 号, 平成 1 年 6 月 19 日  
発行 公開特許公報 1-1553 号掲載) につ  
いては特許法第17条の2の規定による補正があつ  
たので下記のとおり掲載する。 6 (1)

Int. C.I.	識別 記号	府内整理番号
G01N 30/48		C-7621-23
B01I 30/04		C-2104-4G
C12P 21/00		B-8214-4B
// C07K 3/20		7731-4H

平成 4.5.15 発行

手続補正書

平成 4 年 1 月 13 日

特許庁長官 深沢 重 賢

1. 事件の表示

昭和 62 年特許願 814420 号

2. 発明の名称

液体クロマトグラフィー用充填剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒174 京都府板橋区前野町 2 丁目 36 番 9 号

名称 (052) 延光化学工業株式会社

代表者 松本 繁

4. 代理人

住所 〒102 東京都千代田区二番町 1-1

麹町山王マンション 601 号

電話 03(3234)0290

氏名 (8828) 特許士 三浦 邦夫

5. 補正命令の日付 自発

6. 補正の対象

新書及び明細書の発明の名称の欄並びに明細書  
の特許請求の範囲の欄及び発明の詳細な説明の欄

新書

7. 補正の内容

- (1) 新書及び明細書の発明の名称の欄を「液体  
クロマトグラフィー用充填剤」と補正する。
- (2) 特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。
- (3) 明細書 8 頁 5 ~ 6 行の「充填剤及びその製法」  
を「充填剤」と補正する。
- (4) 同 3 頁 8 行の「粒子成分」を「少なくとも  
粒子表面に錫及び/又は鉛を含むアバタイトが存  
在し、全粒子成分」と補正する。
- (5) 同 4 頁下から 8 行の「上記のように、粒子  
成分」を「上記のように、少なくとも粒子表面に  
錫及び/又は鉛を含むアバタイトが存在し、全  
粒子成分」と補正する。

特許請求の範囲

(1) 少なくとも粒子表面に錫及び/又は鉛を含  
むアバタイトが存在し、金粒子成分のうち 5 ~  
100 モル% が錫及び/又は鉛を含むアバタイト  
であることを特徴とする液体クロマトグラフィー  
用充填剤。